

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-325163

(43)Date of publication of application : 18.11.2003

(51)Int.Cl.

C12M 3/00

C12N 5/06

C12Q 1/02

(21)Application number : 2002-371129

(71)Applicant : SUMITOMO BAKELITE CO LTD

(22)Date of filing : 20.12.2002

(72)Inventor : WATANABE YOSHIAKI

(30)Priority

Priority number : 2002062542 Priority date : 07.03.2002 Priority country : JP

(54) FILM FOR CULTURING CELL, METHOD FOR PRODUCING THE SAME, METHOD FOR CULTURING CELL THEREOF AND METHOD FOR BIOASSAY THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a film for culturing cells improving disadvantages of a culture substrate composed of a uniform culture surface mainly for studying specific actions and studying actions between cells and drugs and intercellular interactions and to provide a method for assay using the same.

SOLUTION: The film for cell culture has a region subjected to plasma etching and coated with a protein. Furthermore, the method for producing the film for cell culture comprises carrying out the plasma etching treatment at a level without activating the coated region of the film coated with a patterned photoresist and then forming the region coated with the protein or a synthetic polymer. The film is preferably composed of a fluororesin.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.05.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-325163

(P2003-325163A)

(43)公開日 平成15年11月18日 (2003.11.18)

(51)Int.Cl.⁷C 12 M 3/00
C 12 N 5/06
C 12 Q 1/02

識別記号

F I

テマコード*(参考)

C 12 M 3/00
C 12 Q 1/02
C 12 N 5/00Z 4 B 0 2 9
4 B 0 6 3
E 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 4 頁)

(21)出願番号 特願2002-371129(P2002-371129)
 (22)出願日 平成14年12月20日(2002.12.20)
 (31)優先権主張番号 特願2002-62542(P2002-62542)
 (32)優先日 平成14年3月7日(2002.3.7)
 (33)優先権主張国 日本 (JP)

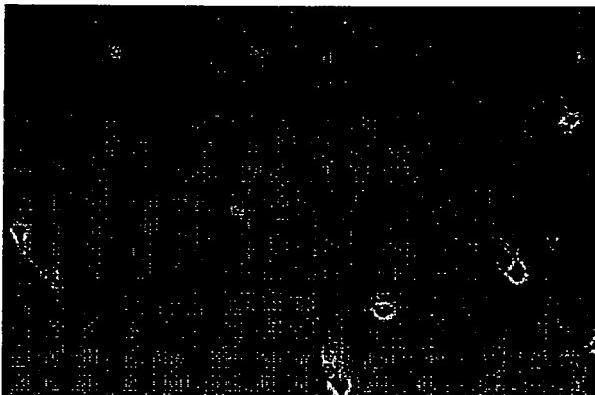
(71)出願人 000002141
 住友ペークライト株式会社
 東京都品川区東品川2丁目5番8号
 (72)発明者 渡辺 芳明
 秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田
 住友ペーク株式会社内
 F ターム(参考) 4B029 AA02 AA08 AA21 BB11 CC01
 CC02
 4B063 QA05 QQ08 QR77 QR84 QX01
 4B065 AA90X CA46

(54)【発明の名称】 細胞培養用フィルム、その製造方法、その細胞培養法及びその生物試験法

(57)【要約】

【課題】特定作用の検討を主とする均一培養表面からなる培養基材の欠点を改善し、細胞-薬物間の作用や細胞間相互作用を検討できる細胞培養用フィルムとこれを用いた試験法を提供する。

【解決手段】 プラズマエッティングし、かつ蛋白質を被覆した領域を有する細胞培養用フィルム、更にはパターン化したフォトレジストを被覆したフィルムに、被覆した領域を活性化しないレベルでプラズマエッティング処理した後、蛋白質または合成高分子を被覆した領域を形成する細胞培養用フィルムの製造方法であり、好ましくは、フィルムがフッ素樹脂からなる細胞培養用フィルムである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プラズマエッティングし、かつ蛋白質を被覆した領域を有する細胞培養用フィルム。

【請求項2】 パターン化したフォトレジストを被覆したフィルムに、被覆した領域を活性化しないレベルでプラズマエッティング処理した後、蛋白質または合成高分子を被覆した領域を形成する細胞培養用フィルムの製造方法

【請求項3】 フィルムがフッ素樹脂からなる請求項1の記載の細胞培養用フィルム。

【請求項4】 神経系細胞培養用である請求項1又は3記載の細胞培養用フィルム。

【請求項5】 請求項1、3～4いずれか記載のフィルム及び基材からなる細胞培養用複合基材。

【請求項6】 請求項1、3～5いずれか記載の細胞培養用フィルム又は細胞培養複合基材を使用する細胞培養法。

【請求項7】 請求項1、3～5いずれか記載の細胞培養用フィルム又は細胞培養複合基材を用いる生物試験法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細胞培養基材及びこれを用いる試験法に関するものである。特に細胞培養に用いる基材とその製造法、その培養方法、及びこれを用いた生物試験法に関するもので、これらは細胞生物学をはじめとする細胞レベルの研究、医薬品の効果を試験する薬理学的、生理学的試験、化学物質の生物毒性を判定する生物試験などに用いられるものである。

【0002】

【従来の技術】 細胞の培養技術は、生物を対象とする様々な分野で用いられる基本技術である。特に生命科学の分野で医薬品の開発や病態メカニズムの解明などには欠くことのできない技術となっている。細胞は一定の容器の中で栄養成分である培養液とともに培養が行われる。この細胞はその性状から、この培養液の中で浮遊した状態で培養されるものと容器の底面に付着した状態で培養されるものに大きく2分される。

【0003】 容器の底面に接着して培養される細胞に対して、ガラス、表面親水化処理プラスチックを基材とする容器が用いられるが、この基材では良好な培養が行えない場合が多い。そこで、この基材に細胞接着性蛋白質をコートして生体内環境により近づける工夫がなされている。この結果、培養状態は改善され良好な培養が行える場合が多い。逆に浮遊系での培養が好適な細胞は接着を抑えるために疎水性のプラスチックやアルブミン、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、シリコーン樹脂、フッ素樹脂などを基材に被覆して培養が行われている。フッ素含有ガス下でプラズマ表面処理する方法も有効である。

10

20

30

40

50

【0004】 しかし、これらは均一な培養面を持つ培養領域の中で同一の細胞集団（单一もしくは複数種の細胞からなる）を培養するものである。近年の細胞生物学の進展にともない、制御された条件下で細胞-薬物間の作用や細胞間相互作用を解明することが病態や薬物の作用を研究する上で重要な要件として考えられるようになってきた。このためには前述の均一培養表面をもつ培養基材を用いた培養法では充分な作用検討を行うことができない。均一な培養表面を加工し、細胞を特定領域に培養する方法は、これまでにも報告されており、基材表面に蛋白質などを加工したもの（非特許文献1、特許文献1、特許文献2、特許文献3など）がある。また微小コントакトプリンティングなどの方法も用いることができる（非特許文献2など）。ただ、これら表面加工したものでは、加工した領域を通常の顕微鏡下で観察することができず、低密度培養を行った場合細胞が制御された領域にあるかどうか判別できない。これを可視化するために、ガラス、石英などで表面にエッティングを行ったもの（非特許文献3など）がある。しかし、これは物理的に加工を施したもので、細胞を特異的に接着培養させる蛋白質の加工を施したものではない。それゆえに適用できる細胞は限定されてしまう。また、ガラス面に合成高分子をコートしてエッティングものが報告されている（非特許文献4）。しかし、この報告でも、特異的な細胞接着を行うために、さらに細胞接着性高分子をコートする必要が生じている。また、エッティングも従来からおこなわれてきた金属層をマスクとする方法を用いており、細胞に対して有害性をもつ金属層部分を完全に除去しない限り、基材自体が細胞毒性を示してしまう。

【0005】

【非特許文献1】 Developmental Biology 44巻、92-101ページ、(1975年)

【特許文献1】 特許2609556号

【特許文献2】 特許2609559号

【特許文献3】 米国特許5470739号

【非特許文献2】 Journal of Biomechanical Engineering 121巻、73-78ページ、(1999年)

【非特許文献3】 Brain Research 446巻、189-194ページ、(1988年)

【非特許文献4】 Journal of Biochemistry 130巻、367-376ページ、(2001年)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、細胞培養法を用いる研究、薬理学的生理学的試験、及び医薬品の開発等に用いられる生物試験法に対して、細胞-薬物間の作用や細胞間相互作用を検討できる培養領域を制御した新たな培養系を提供することである。

【0007】

【問題を解決するための手段】 我々は均一培養表面ではなく、一定の制御された培養表面からなる培養系を得る

ために検討を進め、細胞接着性ないしは非接着性蛋白質を被覆した培養領域を形成すること、かつ細胞毒性をもたず、顕微鏡下容易に制御された領域が観察できなければならぬことに着目し、種々の検討を進めた結果、本発明に至ったものである。即ち本発明は、(1) プラズマエッティングし、かつ蛋白質を被覆した領域を有する細胞培養用フィルム、(2) パターン化したフォトレジストを被覆したフィルムに、被覆した領域を活性化しないレベルでプラズマ処理した後、蛋白質または合成高分子を被覆した領域を形成する細胞培養用フィルムの製造方法、(3) フィルムがフッ素樹脂からなる第(1)項記載の細胞培養用フィルム、(4) 神経系細胞培養用である第(1)、又は(2)～(3)項記載の細胞培養用フィルム(5)第(1)、(3)～(4)項いずれか記載のフィルム及び基材からなる細胞培養用複合基材、(6) 第(1)、(2)～(5)項いずれかの細胞培養用フィルム又は細胞培養用複合基材を用いる細胞培養用複合基材を用いる細胞培養法、(7) 第(1)、(2)～(5)項いずれか記載の細胞培養用フィルム又は細胞培養用複合基材を用いる生物試験法、である。

【0008】

【発明の実施形態】蛋白質を被覆する基材は特に限定されるものではないが、どのような形状でも容易に加工が可能、表面特性の加工も種々の方法が適用できるなどからプラスチックフィルムが好適である。ガラス、シリコーン、金属、金属酸化物などもフィルム状に加工することにより適用は可能である。しかし、溶出物がある、細胞毒性がある、培養液と反応する、容易に変形する、などの基材は使用することはできない。

【0009】本発明に用いるフィルムは、透明性があることが細胞の培養状態を観察できるという点で好ましい。また非活性で耐薬品性が高いフィルムが好適である。フィルムに用いる樹脂としては、フッ素樹脂、環状ポリオレフィン樹脂、ポリエーテルスルホンなどが好適である。細胞生物学の分野で行われる試験法では、蛍光観察するが多く、基材自体が蛍光を発しないフッ素樹脂、環状ポリオレフィン樹脂などは特に好適である。

【0010】均一培養表面ではない一定の制御された培養表面を形成する方法としては、蛋白質や合成高分子を一定領域に限定して、細胞接着領域と非接着領域を形成する手法を用いることができる。フォトレジストで一定領域をマスクしておき、非マスク領域に蛋白質や合成高分子を被覆する方法が好適である。すなわち、フィルムにフォトレジストをコート、露光によるパターン形成はフォトマスクを用いることにより行う。ここで用いる透明フィルムは、耐熱性、耐有機溶剤性があればどのようなものでも可能である。フィルムに、あらかじめプラズマ処理、コロナ放電処理などを行っておくことも好ましい。

【0011】このフォトレジストパターンを形成後プラ

ズマエッティングを行う。このエッティング領域は、次の工程で蛋白質や合成高分子を被覆するが、細胞培養時にこの領域は容易に視認することができる。特に神経細胞のように培養系においても神経突起の成長が観察される細胞では、この領域の視認性は大変有用である。また、マイクロマニュピュレーションにより単一細胞を配置する場合にも接着領域が容易に判断でき操作性が格段に向上がる。過剰量の細胞をアプライしても領域が限定されていることから、一定量の細胞しか培養系に残らず定量性的の確保も容易である。

【0012】プラズマエッティングを過剰に行うと、フォトレジストの被覆効果が低減し、蛋白質や合成高分子を被覆し特定の領域を形成する効果が弱まる。しかし、被覆効果をもたせながら、エッティングを適度に行える条件があり、光学顕微鏡観察を行う通常の細胞培養に用いる場合は、この条件を用いることができる。なお、顕微鏡下では確認できない弱いエッティングでも作製は可能である。

【0013】非エッティング領域を保護するためには、金属層以外のものも同様に使用できる。すなわち保護基材を一定形状に形成しプラズマエッティングするフィルムと密着させればよい。またエッティングもレーザーによる加工や化学薬品での加工も可能であるが、多量の材料を均一条件でドライ加工ができる点ではプラズマエッティングの優位性は高い。

【0014】プラズマエッティングに用いるガスは特に限定されるものではない。フィルム基材の特性、エッティング程度に合わせて、窒素、アルゴン、フッ素、アンモニア、酸素、水素、水などいずれも適用可能である。処理時間、処理強度なども限定要因にはならない。

【0015】本発明のフィルムは、プラズマエッティング後に蛋白質や合成高分子を被覆する。被覆する蛋白質は、その用途により細胞接着性、細胞非接着性いずれのものも適用できる。すなわち、蛋白質の種類は特に限定を受けるものではない。安定した接着性が必用とされる神経細胞などを培養する場合には細胞接着性の蛋白質や合成高分子を被覆する必要がある。細胞接着性のものとしては、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、ポリリジン、ポリオルニチン、ポリアリルアミンなどがあり、これらを単独または複数で用いればよい。逆に、非接着性領域とする場合は細胞非接着性蛋白質を被覆する。例えば細胞への特異作用を持たないアルブミンなどの蛋白質が適する。

【0016】蛋白質や合成高分子はまず、水溶液として基材表面を被覆する。純水、緩衝塩溶液いずれでもよく、一定濃度の溶液を調製する。濃度は特に限定されるものではなく、被覆されたものの要求される必要機能に応じて調製すればよい。被覆は非エッティング領域をフォトレジストで保護した状態、又はフォトレジストを除去した後、いずれで行っても良い。また被覆後の洗浄もフ

(4)

特開2003-325163

6

オトレジストで保護した状態、又はフォトレジストを除去した状態のいずれでも可能である。また、フォトレジスト、有機溶剤を選択することにより被覆する蛋白質や合成高分子を有機溶剤に溶かした状態で被覆することも可能である。

【0017】本発明のフィルムは他の基材、フィルムと複合化が可能である。そのため形状としては複合化する基材によりどのような形状への応用もでき、特に限定を受けるものではない。複合化は加工前、加工後いずれも可能である。特に、耐薬品性、耐熱性を持つフッ素樹脂やエンジニヤリングプラスチックと呼ばれる、高耐熱性、高透明性、高剛性、耐薬品性をもつ樹脂は好適である。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例にもとづき説明する。
(実施例1・比較例1)

実施例1の基材調製：フッ素樹脂フィルム（厚さ $100\mu\text{m}$ 、ダイキン工業製）にフォトレジスト（東京応化工業製）をスピンドルでコート。直径 $50\mu\text{m}$ 形状に露光、現像、洗浄、ベイキングを行った（Canon製）。その後、窒素ガス下プラズマエッチングを 100W で5分間行い、 10mg/mL のポリリジン溶液（シグマ製）をスピンドルでコートした。次いで、直径 15mm の円形にカットし、 99% のエチルアルコール溶液中で超音波処理を5分間行い、レジスト膜を除去した。純水で3回洗浄後乾燥し冷蔵保存した。

【0019】比較例1の基材調製：実施例1と同様の基材、調製法を用いて、プラズマエッチング処理のみは行なわず、他は実施例1とは同じようにして調製した。

比較例2の基材調製：実施例1と同様の基材、調整法を用いて、ポリリジンコートは行なわず、他は実施例1と同じように調製した。

【0020】神経細胞の培養による比較：ラット胎児（胎生17日）の大脳を定法により切り出し細切。神経細*

* 胞分散液（酵素パパイン処方液、住友ベークライト製）中で30分間酵素処理した。再分散後、神経細胞用培養液（住友ベークライト製）で細胞濃度 $5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ に調製した。調製したフィルムを入れた12ウェルの培養プレート（住友ベークライト製）に $1\text{mL}/\text{ウェル量加え}3\text{日間培養した。顕微鏡下培養状態を観察したところ、実施例1のフィルムではエッチング領域に神経突起を伸張した神経細胞が多数認められ、その他の領域ではこのような形態をした神経細胞は認められなかった。比較例1のフィルムでは極めて少数の神経細胞のみ認められたに過ぎず、比較例2のフィルムではエッチング領域を含め全く接着した神経細胞は認められず、多くの細胞は凝集状態となっていた。$

【0021】（実施例2、比較例3）パターン形状を格子様状に変え（格子線幅は $20\mu\text{m}$ ）、プラズマエッチングの処理時間を、実施例2：5分、比較例3：20分とし、他は実施例1と同様に調製した。実施例1と同じく神経細胞液を調製し培養したが、細胞液は $2 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ に調製し、フィルムを入れた24ウェルの培養プレート（住友ベークライト製）に $0.5\text{ mL}/\text{ウェル量加え培養した。3日後顕微鏡観察を行った。実施例2ではパターン上で神経突起を伸展した細胞が観察されたが、比較例3では、エッチング領域以外にも神経突起の伸展が認められ、パターン状には制御された状態ではなかった（図1、2参照）。$

【0022】

【発明の効果】本発明を用いることにより細胞一薬物間の作用や細胞間相互作用を検討できる安定な細胞培養系を得ることができ、細胞に与える薬剤の影響評価、各種因子の検討、細胞間相互作用の評価検討などが効果的に行える。

【図面の簡単な説明】**【図1】**実施例2の拡大写真**【図2】**比較例3の拡大写真**【図1】****【図2】**